

Đặc điểm phân tử đoạn giao gen ITS1 thuộc hệ gen nhân của sán lá gan lớn ở Việt Nam

Molecular characterization of *Fasciola* isolates in Vietnam based on ITS1 sequence of ribosomal DNA

Đỗ Ngọc Ánh

Học viện Quân y

Tóm tắt

Mục tiêu: Phân tích đặc điểm đa hình đoạn giao gen *ITS1* thuộc hệ gen nhân của sán lá gan lớn tại Việt Nam. **Đối tượng và phương pháp:** 16 cá thể sán lá gan lớn thu thập từ 5 vật chủ khác nhau gồm trâu (05 cá thể), bò (06 cá thể), dê (02 cá thể), cừu (02 cá thể) và người (1 cá thể) tại các lò mổ trên địa bàn các tỉnh/thành gồm Hà Nội (4 cá thể), Vĩnh Phúc (1 cá thể), Nghệ An (2 cá thể), Quảng Nam (1 cá thể), Ninh Thuận (4 cá thể), Tây Ninh (1 cá thể), Cần Thơ (1 cá thể) và Đồng Tháp (02 cá thể) theo phương pháp mổ khám trong thời gian từ 2009 đến 2016. Trình tự của cả 16 cá thể được giải trình tự các chỉ thị gen ty thể *nad1*, gen nhân *ITS1* để giám định loài và phân tích đặc điểm đa hình phân tử. **Kết quả:** Bằng các chỉ thị gen ty thể *nad1* và đoạn giao gen, 11 cá thể sán lá gan lớn có kiểu gen phù hợp với *F. gigantica* và 5 cá thể có kiểu gen phù hợp với dạng trung gian. Trên trình tự đoạn giao gen *ITS1* có 5 vị trí biến đổi ở các vị trí khác nhau với 4 kiểu gen đơn bội được xác định. **Kết luận:** Trình tự đoạn giao gen *ITS1* của sán lá gan lớn tại Việt Nam có sự thay đổi đáng kể so với các trình tự tham chiếu trên thế giới.

Từ khóa: Đa hình, đoạn giao gen *ITS1*, sán lá gan lớn, Việt Nam.

Summary

Objective: The aim of the present study was to examine nucleotide variation in the first Internal Transcribed Spacers (ITS-1) region of nuclear ribosomal DNA genes of *Fasciola* in Vietnam. **Subject and method:** Sixteen adult *Fasciola* spp. were collected from buffalo (5 isolates), bovine (6 isolates), sheep (2 isolates), goats (2 isolates), and human (1 isolate) from slaughterhouse in Hanoi city (4 isolates), Vinh Phuc (1 isolate), Nghe An (2 isolates), Quang Nam (1 isolate), Ninh Thuan (4 isolates), Tay Ninh province (1 isolate), Can Tho city (1 isolate), and Dong Thap province (2 isolates), Vietnam, from 2009 to 2016. The ribosomal *ITS1* and mitochondrial genes of *nad1* from individual *Fasciola* isolates were amplified and the PCR products were sequenced by both directions. Nucleotide variation within and between the individuals was evaluated by comparing the sequences of ribosomal *ITS1* region. **Result:** Based on *nad1* and *ITS1* sequences, 11 isolates were identified as *F. gigantica* and 5 isolates were identified as intermediate form (*Fasciola* sp.). Based on *ITS1* sequence, five DNA variable sites were observed in which single-base substitution at different sites was occurred and four haplotypes were present in Vietnam. **Conclusion:** Findings of the study showed that high

Ngày nhận bài: 8/3/2021, ngày chấp nhận đăng: 12/5/2021

Người phản hồi: Đỗ Ngọc Ánh, Email: dranhk61@gmail.com - Học viện Quân y

genetic variation on ITS1 marker was noted in Vietnam isolates in comparison with isolates from other geographical regions of the world.

Keywords: Nucleotide variation, *ITS1* region, *Fasciola*, Vietnam.

1. Đặt vấn đề

Bệnh do sán lá gan lớn (SLGL) là bệnh rất phổ biến ở trâu, bò, dê, cừu..., do *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) và *Fasciola gigantica* (Cobbold, 1885) gây ra. Hai loài *Fasciola hepatica* và *Fasciola gigantica* có phân bố khác nhau, *F. hepatica* phân bố rộng khắp trên thế giới nhưng chủ yếu ở các khu vực có khí hậu ôn đới như châu Âu, châu Mỹ và châu Úc, trong khi *F. gigantica* lại phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới như ở châu Phi và châu Á. Cả hai loài cùng xuất hiện ở khu vực khí hậu cận nhiệt đới. Người là vật chủ tình cờ, nhiễm SLGL do ăn rau sống hoặc uống nước lã có nang ấu trùng còn sống. Bệnh do SLGL ở người được xem là một bệnh nhiệt đới bị lãng quên nhưng gần đây đang có xu hướng tăng trở lại. Tại một số khu vực trên thế giới, bệnh do SLGL ở người có tỷ lệ rất cao và là vấn đề y tế rất được quan tâm [2].

Fasciola spp. có 3 kiểu gen gây bệnh ở người là *F. gigantica*, *F. hepatica* và kiểu trung gian [1]. Hai loài *F. gigantica*, *F. hepatica* có thể phân biệt dựa vào hình thái ngoài [3] nhưng do kích thước và hình dạng rất thay đổi, phụ thuộc nhiều yếu tố như tuổi, vật chủ ký sinh, số lượng sán nhiễm và tình trạng dinh dưỡng của vật chủ, thể nhị bội, tam bội hay hỗn hợp... nên phương pháp hình thái bộc lộ nhiều nhược điểm [1] nhất là ở các khu xuất hiện dạng trung gian, trong đó có Việt Nam [4]. Dạng trung gian bị rối loạn phân bào, chúng không có hoặc có rất ít tinh trùng trong túi tinh nên sinh sản theo kiểu vô tính. Chúng có những bất thường về hình thái và phân tử theo kiểu trung gian của 2 loài (tổ hợp gen nhân của 2 loài hoặc gen nhân của loài này gen ty thể của loài kia) nên rất khó phân loại là *F. hepatica* hay *F. gigantica* [1], [5]. Vì vậy, để có kết quả phân loại SLGL chính xác, sử dụng công cụ sinh học phân tử trên cơ sở kết hợp các chỉ thị gen là rất cần thiết [1], [5], [6]. Các chỉ thị phân tử thường được lựa chọn sử dụng là các

đoạn giao gen ITS1, ITS2 thuộc hệ gen nhân và các gen *nad1*, *cox1* thuộc hệ gen ty thể [1], [5].

Những khác biệt giữa các loài ở các chỉ thị phân tử là rất hữu ích trong việc thiết kế, lựa chọn các kỹ thuật xác định loài [1]. Ở SLGL, đoạn giao gen *ITS1* được nhiều nghiên cứu khác nhau sử dụng để giám định loài do có các đặc điểm đa hình đặc trưng cho loài [7]. Ngoài ra, đặc điểm phân tử còn cung cấp các dữ liệu góp phần phòng chống hiệu quả bệnh do SLGL gây ra cho người và động vật. Ở Việt Nam, dữ liệu về tính đa hình của các chỉ thị phân tử ở SLGL còn rất hạn chế. Nghiên cứu này nhằm các mục tiêu: *Xác định đặc điểm đa hình phân tử đoạn giao gen ITS1 của sán lá gan lớn tại Việt Nam.*

2. Đối tượng và phương pháp

2.1. Đối tượng

Tổng số 16 cá thể SLGL trưởng thành được thu thập từ đường mật của trâu (05 cá thể), bò (06 cá thể), dê (02 cá thể), cừu (02 cá thể) và người (1 cá thể) tại các lò mổ trên địa bàn các tỉnh/thành gồm Hà Nội (4 cá thể), Vĩnh Phúc (1 cá thể), Nghệ An (2 cá thể), Quảng Nam (1 cá thể), Ninh Thuận (4 cá thể), Tây Ninh (1 cá thể), Cần Thơ (1 cá thể) và Đồng Tháp (2 cá thể) theo phương pháp mổ khám trong thời gian từ 2009 đến 2016. Các mẫu sán riêng lẻ được bảo quản trong cồn 70 độ ở -20°C.

2.2. Tách chiết ADN sán lá gan lớn

Khoảng 25mg cơ thể sán lấy từ phần đuôi được tách chiết ADN bằng bộ kit QIAamp DNA Mini Kit (No. 51304, Qiagen, Germany). ADN sau tách chiết được bảo quản ở -20°C cho tới khi thực hiện phản ứng PCR khuếch đại đoạn giao gen *ITS1*.

2.3. Khuếch đại đoạn giao gen *ITS1* và gen ty thể *nad1*

Đoạn giao gen *ITS1* của SLGL được khuếch đại bởi cặp mồi ITS1-F (5'-TTG CGC TGA TTA CGT CCC TG-3) và ITS1-R (5'-TTG GCT GCG CTC TTC ATC

GAC-3') (Integrated DNA Technologies, USA) (Itagaki et al., 2005). Đoạn nucleotid kích thước 630bp chứa một phần gen ty thể *nad1* được khuếch đại bằng cặp mồi Ita10-F (5'-AAG GAT GTT GCT TTG TCG TGG-3') và Ita2-R (5'-GGA GTA CGG TTA CAT TCA CA-3'). Các phản ứng PCR gồm các thành phần 25μl mastermix 2X (Thermo Fisher Scientific, USA), 1μl mỗi mồi (0,2μM), 5μl dung dịch ADN và nước khử ion vừa đủ 50μl. Hỗn dịch phản ứng PCR được thực hiện trên thiết bị luân nhiệt Thermo Mastercycler Gradient (Thermo Fisher Scientific, USA) theo chu trình nhiệt như sau: 1 chu kỳ 94°C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 3 bước 94°C/30 giây, 55°C/30 giây và 72°C/60 giây, cuối cùng là 1 chu kỳ 72°C trong 15 phút. Kết thúc phản ứng PCR, lấy 5μl sản phẩm PCR điện di kiểm tra kết quả trên gel agarose 1,5% trong môi trường đệm TBE 0.5X. Sản phẩm PCR còn lại được bảo quản ở 4°C cho tới khi gửi đi tinh sạch và giải trình tự.

2.5. Giải trình tự gen

Sản phẩm PCR với các cặp mồi Ita10-F, Ita2-R và ITS1-F, ITS1-R của 16 mẫu được gửi tới nhà cung cấp First BASE Laboratories Sdn Bhd service (Kembangan 43300, Selangor, Malaysia) để tinh sạch và giải trình tự với cả 2 chiều. Các trình tự thu được được đọc, chỉnh sửa bằng các phần mềm SeqScape 2.1 của thiết bị giải trình tự ABI 3130 Genetic Analyzer và phần mềm tin sinh học Mega 7.0.9 sau đó so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen. Các cá thể sản được xác định có kiểu gen là *F. gigantica*, *F. hepatica* hay dạng trung gian dựa vào kết quả so sánh trình tự của cả gen ty thể và gen nhân. Cụ thể:

Cá thể có kiểu gen *F. gigantica* (hoặc *F. hepatica*) khi cả trình tự gen ty thể *nad1* và trình tự đoạn giao gen ITS1 thuộc gen nhân phù hợp với trình tự của *F. gigantica* (hoặc *F. hepatica*) trên ngân hàng gen.

Cá thể có kiểu gen trung gian khi trình tự gen ty thể *nad1* phù hợp với *F. gigantica* nhưng

trình tự đoạn giao gen ITS1 thuộc gen nhân phù hợp *F. hepatica* và ngược lại.

2.6. Xác định kiểu gen đơn bội của SLGL dựa vào chỉ thị ITS1

Trên cơ sở trình tự nucleotide đoạn gen ITS-1 của hệ gen nhân, các kiểu gen đơn bội được phân nhóm dựa vào số lượng các nucleotide sai khác với trình tự tham chiếu của *F. gigantica* (AB514853.1, Thailand). Cụ thể như sau: kiểu H0-ITS1.FgVN (không sai khác nucleotide), kiểu H1-ITS1.FgVN (sai khác 1 nucleotide), kiểu H2-ITS1.FgVN (sai khác 2 nucleotide), kiểu H3-ITS1.FgVN (sai khác 3 nucleotide), kiểu H4-ITS1.FgVN (sai khác 4 nucleotide) và kiểu H5-ITS1.FgVN (sai khác 5 nucleotide). Trong trường hợp sai khác cùng số nucleotide nhưng khác vị trí, kiểu gen đơn bội tiếp tục được phân loại bằng cách đánh số sau chấm của kiểu ban đầu. Ví dụ: H1.1-ITS1.FgVN và H1.2-ITS1.FgVN.

2.7. Xử lý kết quả nghiên cứu

Các số liệu nghiên cứu được nhập liệu và phân tích bằng phần mềm thống kê IBM SPSS Statistics 20.0 và các phần mềm tin sinh Mega7.0.9, BioEdit. Các trình tự thu được được so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen sử dụng công cụ BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3. Kết quả

3.1. Kết quả xác định loài sán lá gan lớn bằng gen ty thể *nad1* và đoạn giao gen ITS1

Kết quả phân tích trình tự đoạn gen ty thể *nad1* và đoạn giao gen ITS1 của 16 cá thể trong nghiên cứu cho thấy, 11 cá thể có kiểu gen là *F. gigantica* và 5 cá thể là dạng trung gian *Fasciola* sp. (Bảng 1). Ở trâu, bò và dê, SLGL có cả 2 kiểu gen *F. gigantica* và dạng trung gian *Fasciola* sp. Ở người và cừu mới chỉ thấy kiểu gen *F. gigantica*.

Bảng 1. Kết quả đăng ký đoạn trình tự gen ty thể *nad1* và ITS1 trên ngân hàng gen

Mã số cá thể	Vật chủ	Năm phân lập	Nơi phân lập	Mã số gen <i>nad1</i> trên ngân hàng gen	Mã đoạn ITS1 trên ngân hàng gen	Kết quả xác định loài sán
SLGL-N	Người	2010	Hà Nội	-	MW842569.1	<i>F. gigantica</i>
VN16DNT1	Dê	2016	Ninh Thuận	MF430856.1	MW842570.1	<i>Fasciola</i> sp.
VN16DNT2	Dê	2016	Ninh Thuận	-	MW842571.1	<i>F. gigantica</i>
VN16CNT1	Cừu	2016	Ninh Thuận	MF430857.1	MW842572.1	<i>F. gigantica</i>
VN16CNT2	Cừu	2016	Ninh Thuận	-	MW842573.1	<i>F. gigantica</i>
VN10BHN1.8	Bò	2010	Hà Nội	MF430851.1	MW842574.1	<i>F. gigantica</i>
VN10BHN1.9	Bò	2010	Hà Nội	MF430852.1	MW842575.1	<i>Fasciola</i> sp.
VN09BQN1.1	Bò	2009	Quảng Nam	-	MW842576.1	<i>F. gigantica</i>
VN10BNA1.2	Bò	2010	Nghệ An	-	MH790325.1	<i>Fasciola</i> sp.
VN09BTN1.1	Bò	2009	Tây Ninh	-	MW842577.1	<i>F. gigantica</i>
VN14BCT2	Bò	2014	Cần Thơ	-	MW842578.1	<i>F. gigantica</i>
VN15Tr-HN1	Trâu	2015	Hà Nội	MF430854.1	MW842579.1	<i>Fasciola</i> sp.
VN15TrVP1	Trâu	2015	Vĩnh Phúc	MF430853.1	MW842580.1	<i>F. gigantica</i>
VN15Tr-NA5	Trâu	2015	Nghệ An	MF430855.1	MH790326.1	<i>F. gigantica</i>
VN15Tr-DT1	Trâu	2015	Đồng Tháp	-	MW842581.1	<i>F. gigantica</i>
VN15Tr-DT2	Trâu	2015	Đồng Tháp	-	MW842582.1	<i>Fasciola</i> sp.

Kết quả so sánh trình tự đoạn gen *nad1* của cả 16 cá thể SLGL cho thấy, tất cả đều có tỷ lệ tương đồng là 99,4% so với trình tự AB385616.1 của *F. gigantica* (Việt Nam) trên ngân hàng gen. Trong khi tỷ lệ tương đồng chỉ < 91,4% khi so sánh với trình tự AB477361.1 của *F. hepatica* (Trung Quốc). Trình tự của 7 đoạn gen *nad1* của 7 cá thể sán đã được đăng ký thành công và cấp mã số trên ngân hàng gen như trong Bảng 1.

3.2. Kết quả phân tích đa hình đoạn giao gen ITS1 thuộc gen nhân

Đối với đoạn giao gen ITS1, trình tự đoạn này của toàn bộ 16 cá thể đã được cấp mã số trên genbank (Bảng 1). Đoạn này có kích thước 432 nucleotide. Kết quả từ Bảng 2 chỉ ra rằng, đoạn giao gen ITS1 của hầu hết các chủng SLGL trong nghiên cứu này có tỷ lệ tương đồng > 98,9% giữa các chủng với nhau và với *Fasciola* trên thế giới. 14/16 chủng SLGL Việt Nam có tỷ lệ tương đồng với *F. gigantica* cao hơn với *F.*

hepatica. 2/16 chủng (10B-HN1.9 và 15Tr-DT2) có kết quả ngược lại, tương đồng với *F. hepatica* cao hơn với *F. gigantica*.

Bảng 2. Tỷ lệ tương đồng nucleotide đoạn giao gen ITS1 của SLGL trong nghiên cứu với các chủng trên ngân hàng gen

	Mẫu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	AB514853.1 _F.g (Thailand)	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
2	AB514866.1 _F.sp (Japan)	99,1	100	99,1	98,9	99,4	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,7	99,1	99,1	99,2	99,1	99,1	98,9	99,1
3	AB514847.1 _F.h (Uruguay)	99,1	99,1	100	98,9	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9	100
4	SLGL-N	99,8	98,9	98,9	100	99,5	99,8	99,8	99,8	99,8	98,9	99,8	99,2	99,8	99,8	99,7	99,8	99,8	99,7	98,9
5	VN16DNT1	99,7	99,4	99,1	99,5	100	99,7	99,7	99,7	99,7	99,1	99,7	99,7	99,7	99,7	99,8	99,7	99,7	99,5	99,1
6	VN16DNT2	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
7	VN16CNT1	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100,0	100,0	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
8	VN16CNT2	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100,0	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
9	VN10BHN1.8	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
10	VN10BHN1.9	99,1	99,1	100	98,9	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9	100
11	VN09BQN1.1	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
12	VN10BNA1.2	99,4	99,7	99,1	99,2	99,7	99,4	99,4	99,4	99,4	99,1	99,4	100	99,4	99,4	99,5	99,4	99,4	99,2	99,1
13	VN09BTN1.1	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100,0	99,8	100	100	99,8	99,1
14	VN14BCT2	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
15	VN15Tr-HN1	99,8	99,2	99,1	99,7	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8	99,1	99,8	99,5	99,8	99,8	100	99,8	99,8	99,7	99,1
16	VN15TrVP1	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100,0	99,8	99,1
17	VN15Tr-NA5	100	99,1	99,1	99,8	99,7	100	100	100	100	99,1	100	99,4	100	100	99,8	100	100	99,8	99,1
18	VN15Tr-DT1	99,8	98,9	98,9	99,7	99,5	99,8	99,8	99,8	99,8	98,9	99,8	99,2	99,8	99,8	99,7	99,8	99,8	100	98,9
19	VN15Tr-DT2	99,1	99,1	100	98,9	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	100	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	99,1	98,9	100

Bảng 3. Các vị trí có sai khác về nucleotide và acid amin của SLGL Việt Nam và SLGL thế giới của đoạn giao gen ITS1

Loài/Chủng SLGL	Vị trí biến đổi nu trên ITS1					Mã số	Quốc gia	Kiểu gen đơn bội
	24	114	208	286	306			
<i>F. gigantica</i>	T	T	T	A	T	AB514853.1	Thailand	-
<i>F. gigantica</i>	T	T	T	A	T	AB207143.1	Indonesia	-

<i>F. gigantica</i>	T	T	T	A	T	KC476171.1	Bangladesh	-
<i>F. gigantica</i>	T	T	T	A	T	AB514855.1	Zambia	-

Bảng 4. Các vị trí có sai khác về nucleotide và acid amin của SLGL Việt Nam và SLGL thế giới của đoạn giao gen ITS1 (tiếp theo)

Loài/Chủng SLGL	Vị trí biến đổi nu trên ITS1					Mã số	Quốc gia	Kiểu gen đơn bội
	24	114	208	286	306			
<i>F. gigantica</i>	T	T	T	A	T	AB514857.1	Vietnam	-
<i>F. gigantica</i>	T	T	T	A	T	KF425321.1	Egypt	-
<i>F. hepatica</i>	C	A	C	T	C	AB514847.1	Uruguay	-
<i>F. hepatica</i>	C	A	C	T	C	AB207140.1	Australia	-
<i>F. hepatica</i>	C	A	C	T	C	AB207141.1	Ireland	-
<i>F. hepatica</i>	C	A	C	T	C	KJ689325.1	Peru	-
<i>F. hepatica</i>	C	A	C	T	C	LC076147.1	Egypt	-
<i>Fasciola sp.</i>	T	T	T	A	T	AB211238.1	Korea	-
<i>Fasciola sp.</i>	C	A	C	T	C	AB385611.1	Vietnam	-
<i>Fasciola sp.</i>	C	A	C	T	C	AB514861.1	China	-
SLGL-N	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN16DNT1	Y	T	T	W	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H2-ITS1.FgVN
VN16DNT2	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN16CNT1	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN16CNT2	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN10BHN1.8	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN10BHN1.9	C	A	C	T	C	Nghiên cứu này	Vietnam	H5-ITS1.FgVN
VN09BQN1.1	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN10BNA1.2	Y	T	T	T	C	Nghiên cứu này	Vietnam	H3-ITS1.FgVN
VN09BTN1.1	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN14BCT2	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN15Tr-HN1	Y	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H1-ITS1.FgVN
VN15TrVP1	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN15Tr-NA5	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN15Tr-DT1	T	T	T	A	T	Nghiên cứu này	Vietnam	H0-ITS1.FgVN
VN15Tr-DT2	C	A	C	T	C	Nghiên cứu này	Vietnam	H5-ITS1.FgVN

So sánh tương đồng nucleotide của đoạn giao gen ITS1 ở nghiên cứu này với trình tự tham chiếu AB514853.1 của SLGL ở Thái Lan cho thấy, hầu hết các chủng SLGL trong nghiên cứu này sai khác không quá 2 nucleotide so với *F. gigantica*. Tuy nhiên, riêng 2 cá thể 10B-HN1.9 và 15Tr-DT2 có 5 vị trí sai khác so với *F. gigantica*. Các sai khác này biến đổi theo hướng phù hợp với *F. hepatica*.

Bảng 5. Thành phần các nucleotide trên đoạn gen ITS1 được phân tích của các chủng SLGL Việt Nam và thế giới

TT	Chủng/ Mã số	Loài	Quốc gia	Nucleotide A		Nucleotide C		Nucleotide G		Nucleotide T		Chưa xác định		A+T		G+C	
				SL	%	SL	%	SL	%	SL	%	SL	%	SL	%	SL	%
1	AB51485 3.1	<i>F. gigantica</i>	Thailand	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
2	AB51486 6.1	<i>Fasciola</i> sp.	Japan	90	20,79	112	25,87	110	25,40	116	26,79	5	1,15	206	47,58	222	51,27
3	AB51484 7.1	<i>F. hepatica</i>	Uruguay	91	21,02	115	26,56	110	25,40	117	27,02	0	0	208	48,04	225	51,96
4	SLGL-N		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
5	VN16DNT 1		Việt Nam	90	20,79	112	25,87	110	25,40	119	27,48	2	0,46	209	48,27	222	51,27
6	VN16DNT 2		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
7	VN16CNT 1		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
8	VN16CNT 2		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
9	VN10BHN 1.8		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
10	VN10BHN 1.9		Việt Nam	91	21,02	115	26,56	110	25,40	117	27,02	0	0	208	48,04	225	51,96
11	VN09BQ N1.1		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
12	VN10BNA 1.2		Việt Nam	90	20,79	113	26,10	110	25,40	119	27,48	1	0,23	209	48,27	223	51,50
13	VN09BTN 1.1		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
14	VN14BCT 2		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
15	VN15Tr- HN1		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	119	27,48	1	0,23	210	48,50	222	51,27
16	VN15TrV P1		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
17	VN15Tr- NA5		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	120	27,71	0	0	211	48,73	222	51,27
18	VN15Tr- DT1		Việt Nam	91	21,02	112	25,87	110	25,40	119	27,48	1	0,23	210	48,50	222	51,27
19	VN15Tr- DT2		Việt Nam	91	21,02	115	26,56	110	25,40	117	27,02	0	0	208	48,04	225	51,96

Tỷ lệ A, C, G, T trên đoạn *ITS1* dao động từ 20,79 đến 27,71%. Tỷ lệ A + T từ 48,04 đến 48,73%, tỷ lệ G + C từ 51,27 đến 51,96%.

4. Bàn luận

Ở nghiên cứu này, các mẫu sán được định danh bằng 2 chỉ thị phân tử gồm đoạn giao gen ITS1 thuộc gen nhân và đoạn gen ty thể *nad1*. Kết quả định danh cho thấy, 11 cá thể là *F. gigantica* thuần chủng và 5 cá thể dạng trung gian. Đoạn trình tự dài 680bp gồm 1 phần gen 18S, toàn bộ đoạn ITS1 và một phần gen 5.8S của 16 cá thể SLGL thu thập từ trâu, bò, dê, cừu và người được giải trình tự để phân tích đặc điểm phân tử. Kết quả cho thấy, đoạn giao gen *ITS1* có vài vị trí sai khác giữa *F. gigantica* và *F. hepatica* nhưng ít có sự khác biệt trong cùng 1 loài. Những chỉ thị phân tử có đặc điểm này thường được lựa chọn sử dụng để giám định loài [7], [6]. Theo Mas-Coma S và cộng sự (2009), chiều dài đoạn giao gen *ITS1* có kích thước 432bp ở cả *F. gigantica* và *F. hepatica* thuần chủng [1]. Trong khi, theo Lin và CS (2007) đoạn *ITS1* của SLGL tại Trung Quốc có chiều dài 422bp [9]. Trong một nghiên cứu mới đây, nghiên cứu của Galavani H và cộng sự (2016) cho thấy, đoạn *ITS1* của SLGL ở Iran có chiều dài 428bp [10]. Khi so sánh trình tự đoạn *ITS1* giữa hai loài *F. gigantica* và *F. hepatica* thấy 5 điểm đa hình ở các vị trí số 24, 114, 208, 286 và 306 [1], [7]. Trong khi, ở SLGL dạng trung gian (*Fasciola* sp.) có số nucleotide sai khác nằm giữa *F. hepatica* và *F. gigantica* [6]. Trên đoạn *ITS1*, ở mỗi loài thường chỉ ghi nhận 1 haplotype với tên gọi là FhITS1-HA ở *F. hepatica* và FgITS1-A ở *F. gigantica* [1].

Đoạn *ITS1* dài 432bp ở nghiên cứu này đã được so sánh với các trình tự tham chiếu trên ngân hàng gen. Kết quả so sánh cho thấy, có không quá 5 vị trí nucleotide sai khác giữa SLGL Việt Nam so với SLGL thế giới (Bảng 3). Các sai khác này nằm ở các vị trí số 24, 114, 208, 286 và 306 giống như Mas-Coma S và cộng sự (2009) đã thông báo [1]. Kết quả phân nhóm kiểu gen đơn bội cho thấy, 11 cá thể thuộc nhóm H0-ITS1.FgVN, 1 cá thể thuộc nhóm H1-ITS1.FgVN, 1 cá thể thuộc nhóm H2-ITS1.FgVN, 1 cá thể thuộc nhóm H3-ITS1.FgVN và 2 cá thể thuộc nhóm H5-ITS1.FgVN. Nhóm H0-ITS1.FgVN tương đồng hoàn toàn về nucleotide so với *F. gigantica* thuần chủng ở Thái Lan (AB514853.1), Indonesia (AB207143.1), Bangladesh (KC476171.1), Zambia (AB514855.1), Ai Cập (KF425321.1) và Việt Nam (AB514857.1). Nhóm H5-ITS1.FgVN tương đồng

hoàn toàn về nucleotide so với *F. hepatica* (AB514847.1, Uruguay; AB207140.1, Úc; AB207141.1, Ireland; KJ689325.1, Peru; LC076147.1, Ai Cập) và *Fasciola* sp. (AB385611.1, Việt Nam; AB514861.1, Trung Quốc). Các nhóm H1-ITS1.FgVN, H2-ITS1.FgVN và H3-ITS1.FgVN có tỷ lệ tương đồng về nucleotide so với *F. gigantica* cao hơn so với *F. hepatica* (Bảng 3). Tuy nhiên, các vị trí sai khác của H1-ITS1.FgVN, H2-ITS1.FgVN và H3-ITS1.FgVN với *F. gigantica* và *F. hepatica* là chưa thực sự rõ ràng do 1 số nucleotide ở các vị trí 24 và 286 có tính đa hình. Mặt khác, chúng tôi cũng phát hiện 1 số chủng có các điểm đa hình như: ở vị trí số 24 của cá chủng 16D-NT1, 10B-NA1.2 và 15Tr-HN1 là nucleotide Y (T hoặc C); ở vị trí số 286 của chủng 16D-NT1 là W (A hoặc T). Các điểm đa hình này làm cho việc so sánh tỷ lệ tương đồng nucleotide giữa các chủng này với SLGL trên thế giới có sự biến động. Tuy nhiên, khảo sát trên ngân hàng gen cũng thấy 1 số trình tự có các điểm đa hình này như trình tự AB514866.1 của SLGL *Fasciola* spp. ở Nhật Bản.

Phân tích thành phần nucleotide trên đoạn *ITS1* của SLGL Việt Nam cho thấy, nucleotide T chiếm tỷ lệ cao nhất với 27,02 - 27,71% và thấp nhất là nucleotide A với 20,79 - 21,02%. Tỷ lệ GC dao động từ 51,27 đến 51,96% (Bảng 4). Theo Mas Coma S và cộng sự (2009), tỷ lệ GC ở đoạn gen này của *F. hepatica* cao hơn so với *F. gigantica* (51,85% so với 51,16%). Ở nghiên cứu này, tỷ lệ GC có sự khác biệt với thông báo của Mas Coma S và cộng sự (2009). Ở nhóm H5-ITS1.FgVN tỷ lệ GC là 51,96%, cao hơn các nhóm khác nhưng phù hợp với tỷ lệ GC của sán *F. hepatica* (AB514847.1, Uruguay). Ở nhóm H0-ITS1.FgVN và các nhóm còn lại, tỷ lệ GC là 51,27% phù hợp với tỷ lệ này ở *F. gigantica* (AB514853.1, Thái Lan) và *Fasciola* sp. (AB514866.1, Nhật Bản). Đối chiếu với kết quả giám định loài thấy rằng, nhóm H0-ITS1.FgVN ở Việt Nam là các cá thể *F. gigantica* thuần chủng. Các nhóm khác (từ H1-ITS1.FgVN đến H5-ITS1.FgVN) có số nucleotide sai khác nằm giữa *F. hepatica* và *F. gigantica*, là các cá thể trung gian. Kết quả này tương tự như kết quả của Itagaki và cộng sự (2009) và Lin RQ và cộng sự (2007) trước đó đã công bố [5], [9]. Ngoài ra, số lượng nucleotide G trên đoạn

giao gen ITS1 không thay đổi giữa các loài SLGL. Sự biến đổi nucleotide xảy ở các nhóm từ H1-ITS1.FgVN đến H5-ITS1.FgVN chủ yếu theo hướng T chuyển thành C (nucleotide số 24, 208, 306), T chuyển thành A (nucleotide số 114) và A chuyển thành T (nucleotide số 286). Các biến đổi này làm xuất hiện thêm các vị trí tương đồng của SLGL ở Việt Nam với *F. hepatica*, làm giảm vị trí tương đồng với *F. gigantica*.

5. Kết luận

Bằng các chỉ thị gen ty thể *nad1* và đoạn giao gen ITS1, 11 cá thể sán lá gan lớn được xác định có kiểu gen phù hợp với *F. gigantica* và 5 cá thể phù hợp với dạng trung gian. Trên trình tự đoạn giao gen ITS1 xuất hiện 5 biến đổi ở các vị trí khác nhau với 4 kiểu gen đơn bội được xác định.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ một phần kinh phí từ đề tài cấp Nhà nước mã số KC.10.26/06-10. Xin chân thành cảm ơn Bộ môn Ký sinh trùng và Côn trùng, Học viện Quân y đã cho phép tôi sử dụng các trang thiết bị cho các phân tích sinh học phân tử.

Tài liệu tham khảo

- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD, Fasciola (2009) *Lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and Control*. Advances in Parasitology, Academic Pressv 69: 45-146.
- Mas-Coma S, JEsteban JG, Bargues MD (1999) *Epidemiology of human fascioliasis: A review and proposed new classification*. Bulletin of the World Health Organization 77(4): 340-346.
- Toledo T, Fried B. Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology, vol 766. Springer New York; 2014.
- Le TH, De NV, Agatsuma T, Thi Nguyen TG, Nguyen QD, McManus DP, Blair D (2008) *Human fascioliasis and the presence of hybrid/introgressed forms of Fasciola hepatica and Fasciola gigantica in Vietnam*. International Journal for Parasitology 38(6): 725-730.
- Itagaki T, K. Sakaguchi, T. Terasaki, O Sasaki, S Yoshihara, T Van Dung (2009) *Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of Fasciola in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA*. Parasitology International. 58(1): 81-85.
- Itagaki T, Kikawa M, Terasaki K, Fukuda K (2005) *Molecular Characterization of Parthenogenic Fasciola sp. in Korea on the Basis of DNA Sequences of Ribosomal ITS1 and Mitochondrial NDI Gene*. Journal of Veterinary Medical Science 67(11): 1115-1118.
- Sankar M, Prasad A, Singh C, Kumar M, Singh S (2007) *Characterization of internal transcribed spacer (ITS-1) ribosomal DNA sequence of Fasciola gigantica*. The Indian Journal of Veterinary Research 16(2): 9-13.
- Ichikawa M, Itagaki T (2010) *Discrimination of the ITS1 types of Fasciola spp. based on a PCR-RFLP method*. Parasitology Research 106(3): 757-761.
- Lin RQ, Dong SJ, Nie K, Wang CR, Song HQ, Li AX, Huang WY, Zhu XQ (2007) *Sequence analysis of the first internal transcribed spacer of rDNA supports the existence of the intermediate Fasciola between F. hepatica and F. gigantica in mainland China*. Parasitology Research 101(3): 813-817.
- Galavani H, Gholizadeh S, Hazrati Tappeh (2016) *Genetic characterization of fasciola isolates from west azerbaijan province Iran based on ITS1 and ITS2 sequence of Ribosomal DNA*. Iran J Parasitol 11(1): 52-64.